भारतीय वैज्ञानिक एवं औद्योगिक अनुसंधान पत्रिका
वर्ष 31 अंक (2) दिसम्बर 2023 पृ. 95-102
DOI: 10.56042/bvaap.v31i2.3159

ग्रेसिलेरिया ड्यूरा (रोडोफाइटा) में एसएसआर मार्कर्स द्वारा आनुवंशिक विविधता का अध्ययन

पंकज एस दवंगे, वैभव ए मंत्री एवं संतलाल जैसवार
अप्लाइड फाइकोलॉजी और जैव प्रौद्योगिकी विभाग,
सीएसआईआर-केंद्रीय नमक और समुद्री रासायनिक अनुसंधान संस्थान, गिजुभाई बधेका मार्ग, भावनगर 364002 (गुजरात)
अकादमी ऑफ़ साइंटिफिक एंड इनोवेटिव रिसर्च (एसीएसआईआर), गाज़ियाबाद 201002 (उत्तर प्रदेश)
[ई-मेलः santlal@csmcri.res.in एवं vaibhav@csmcri.res.in]

सारांशः प्रस्तुत शोध में लाल अगरोफाइट प्रजाति *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* की आनुवंशिक विविधता का पता लगाने का प्रयास किया गया है। यह अपनी उच्च गुणवत्ता वाले अगरोज़ के उत्पादन के लिए प्रसिद्ध है। पहले से हुए शोधों में व्यापारिक उद्देश्यों के लिए *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के जीवन इतिहास चरणों के बीच अंतर का उपयोग करने की क्षमता स्थापित की गई है। इस प्रजाति के आनुवंशिक संरचना के गहरे अध्ययन के लिए, माइक्रोसैटलाइट (एसएसआर) मार्कर्स का उपयोग किया गया गया, जिसमें गुजरात के वेरावल और आद्री से इकट्ठे किए गए स्पेसिमेंस का समावेश है। इस अध्ययन में तीन एसएसआर मार्कर्स का उपयोग आनुवंशिक विविधता का मूल्यांकन करने के लिए किया गया, यहाँ पर अनेक मापदंडों का उपयोग किया गया, जैसे कि परिवर्तनशील सूचना सामग्री (PIC), मार्कर सूचकांक (MI), रिसॉल्विंग पावर (RP) और शैनन वीवर सूचकांक (H')। परिणामों में इन मापदंडों के लिए विभिन्न मानों की विविधता का पता लगाया गया, जहां परिवर्तनशील सूचना सामग्री 0.25 से 0.35, मार्कर सूचकांक 0.45 से 0.92, रिसॉल्विंग पावर 2.89 से 4.14 और शैनन वीवर सूचकांक 2.29 से 3.2 तक पाया गया। यह डेटासेट *जी. ड्यूरा* की आनुवंशिक विविधता पर पहला संपूर्ण डेटा है, जो पॉपुलेशन में अंतरों की समझ में महत्वपूर्ण योगदान करेगा। यह अध्ययन उद्दीपकों के चयन और व्यापारिक खेती के लिए आगे की जांचों के मार्ग को खोलेगा।

Study of genetic variation in agarophyte *Gracilaria dura* (Rhodophyta) through SSR markers

Pankaj S Dawange, Vaibhav A Mantri & Santlal Jaiswar
Division of Applied Phycology and Biotechnology, CSIR-Central Salt & amp; Marine Chemicals Research Institute,
Gijubhai Badheka Marg, Bhavnagar 364002 (Gujarat)
Academy of Scientific and Innovative Research (AcSIR), Ghaziabad 201002 (Uttar Pradesh)
[Email: santlal@csmcri.res.in & vaibhav@csmcri.res.in]

Abstract

A study was conducted to explore the genetic diversity of the red agarophyte species *Gracilaria dura*, renowned for the production of high-quality agarose. Previous research has already established the potential for exploiting differences among life-history stages for commercial purposes. In order to gain deeper insights into the genetic makeup of this species, microsatellite (SSR) markers were employed, using specimens collected from Veraval and Adri in Gujarat, India. The study evaluated genetic diversity for three SSR loci, employing various measures such as polymorphic information content, marker index, resolving power, and Shannon Weaver index. The results revealed a range of values for these measures, with polymorphic information content ranging from 0.25 to 0.35, marker index from 0.45 to 0.92, resolving power from 2.89 to 4.14, and Shannon Weaver index from 2.29 to 3.2. This dataset represents the first comprehensive data on the genetic diversity of *G. dura*, which will greatly contribute to our understanding of population variations. This will pave the way for further investigations into the selection of strains and commercial cultivation of this algae.

प्रस्तावना

समुद्री शैवाल पृथ्वी पर सबसे कुशल बायोमास उत्पादक है, जिसका उपयोग औद्योगिक रूप से खाद्य एवं चारा, ऊर्जा, दवाई, सौंदर्य प्रसाधनों तथा कई अनुप्रयोगों में हो रहा है[1,2,3]। समुद्री शैवाल अगार, कैरेजीनन और एल्जिनिक एसिड जैसे औद्योगिक रूप से महत्वपूर्ण हाइड्रोकोलॉइड्स के एकमात्र स्रोत हैं। इसके अलावा, ये पोटैशियम और आयोडीन के भी स्रोत होते हैं[4]। रोडोफाइटा समूह में ग्रेसिलेरिया एक ऐसी जाती है जो सबसे ज्यादा वैविध्यसभर है, जिसमें 287 प्रजातियां भारतीय, प्रशांत महासागर और अटलांटिक महासागर में पायी जाती हैं[5]। इन विविध जातियों के साथ, ग्रेसिलारिया उद्योगों को 15,000 टन अगार की आपूर्ति करता है, जिसका मूल्य 300 मिलियन यूएसडी 6 है। अगारोफाइट *ग्रेसिलेरिया इयूरा* का कृषि मूल्य विभिन्न विशेषताओं पर निर्भर करता है। सबसे महत्वपूर्ण विशेषताओं में विकास दर और गुणवत्ता युक्त अगार का उत्पादन शामिल है। आनुवंशिक विविधता अध्ययन नस्ल उत्पादन और स्ट्रेन सुधार कार्यक्रमों में महत्वपूर्ण स्थान रखते हैं। यह जर्मप्लाज्म का उत्कृष्ट उपयोग और प्रभावी स्ट्रेन के विकास और सुधार को सुनिश्चित करता है। विभिन्न स्ट्रेन और पॉपुलेशन के बीच की आनुवंशिक विविधता की जांच उच्च विकास दर और अगार उत्पादन से संबंधित जीनों की पहचान करने में सहायक हो सकता है।

ग्लोबल वार्मिंग और मानवीय गतिविधियों के कारण महत्वपूर्ण जलवायुकीय, पर्यावरणीय और पारिस्थितिकीय परिवर्तन हो रहे हैं। इससे शैवाल के वास्तविक स्थान में परिवर्तन और जर्मप्लाज्म का विघटन जैसी विभिन्न समस्याएं उत्पन्न हो रही हैं[7,8]। शैवाल की आनुवंशिक विविधता, विकास, जैववंशशास्त्र, जैवभूगोल और इतिहास का अध्ययन करने के लिए आनुवंशिक जानकारी एक उत्कृष्ट उपकरण प्रदान करती है[9]। आनुवंशिक विविधता का मापन जो मॉलीक्यूलर उपकरणों से किया जाता है, मॉलीक्यूलर मार्कर तकनीक से इसमें गति प्राप्त हुई है। आनुवंशिक विविधता अध्ययन के लिए मॉलीक्यूलर तकनीकों का अवलोकन हमें अंतर-प्रजातीय और प्रजातीय स्तरों पर मौजूद विविधता की मात्रए उनके स्थानों के बीच आंतरिक विविधता संरचना, जीन प्रवाह, आनुवंशिक दूरी और प्राकृतिक इतिहास की अवधारणा के बारे में मूल्यवान जानकारी प्रदान करता है[10]। मॉर्फोलॉजिकल और साइटोलॉजिकल वर्णन की सीमाओं के साथ-साथ मॉलीक्यूलर तकनीकों की प्रगति ने पॉपुलेशन और आनुवंशिक अनुसंधानों में मॉलीक्यूलर मार्कर्स को सबसे पसंदीदा उपकरण बना दिया है।

समुद्री जातियों में मॉलीक्यूलर मार्कर की जांच, आनुवंशिक परिवर्तनों के बारे में मूल्यवान जानकारी प्रदान करती है जो जाति के भीतर और जातियों के बीच में होते हैं। इसके अलावा, यह जनसंख्या संरचना के बारे में महत्वपूर्ण जानकारी प्रदान करता है, जो प्रभावी प्रबंधन रणनीतियों के विकास में उपयोगी हो सकती है। विभिन्न भौगोलिक समूहों में आनुवंशिक विविधता के अपर्याप्त ज्ञान ने नैसर्गिक जर्मप्लाज्म की कमी को उजागर किया है, विशेष रूप से कुछ जातियों के लिए। इसी वजह से यह नैसर्गिक स्टॉक की कमी केंद्रित चयनीय प्रजनन कार्यक्रमों पर नकारात्मक प्रभाव डालता है। इसलिए, समुद्री शैवाल के बीच आने वाली आनुवंशिक विविधता का मुख्यतः उच्च विकास दर और प्रचुर अगार उत्पादन प्रदर्शित करने वाले विशेष प्रजातियों के बीच विस्तृत अध्ययन करना महत्वपूर्ण है। इस ज्ञान का उपयोग प्रजातियों के संरक्षण और पुनर्स्थापना में भी किया जा सकता है, जिससे हम उनके मूल स्थान और जैविकीय संबंधों की और अधिक समझ प्राप्त कर सकते हैं, और खेती के लिए नस्लों का विकास कर सकते हैं। विभिन्न आणविक चिह्नकारों के द्वारा समुद्री शैवाल की आनुवंशिक विविधता की जांच करने के लिए वर्तमान में कई मॉलीक्यूलर मार्कर उपलब्ध हैं और इनका व्यापक रूप से इस्तेमाल भी किया जा रहा है। इनमें अलोजाइम[11], आरएफएलपी (RFLP)[12], आईएसएसआर (ISSR)[13], माइक्रोसैटेलाइट मार्कर[14,15,16,17] आरएएपीडी (RAPD)[18], एएफएलपी (AFLP)[19], और डीएनए सीक्वेंसिंग 20 का उपयोग होता हैं।

माइक्रोसैटेलाइट्स, जिन्हें एसएसआर के रूप में भी जाना जाता है, एकांत सारणियों में पाए जाने वाले मोनो-, डाई-, त्रि-, चतुर्थ-, या पंचानुक्रमिक पुनरावृत्ति इकाइयों से मिलकर बने हुए आनुक्रमिक एकाइयाँ होती हैं, जो कई यूकैरियोटिक प्रजातियों के जीनोम में टेंडम सरणियों के रूप में पाए जाते हैं[21]। इन माइक्रोसैटेलाइट्स का आनुवंशिकीय और भूमिका में विस्तारित उपयोग जीनेटिक्स और पृथ्वीय पौधों के प्रजनन में हुआ है[22], क्योंकि इनकी सुगम विशेषताएँ होती हैं जैसे कि विश्वसनीय पुनःउत्पादकता, उच्चस्तरीय बहुमुखी पुनरावृत्ति, सहसंबंधी विरासत, और व्यापक वितरण। लाल रंग के शैवाल (रोडोफाइटा) एक विशिष्ट यूकैरियोटिक पंथ है, जिसके सदस्यों के न्यूक्लियर, प्लास्टिड और माइटोकॉन्ड्रियल जीनों के जैववंशीय विश्लेषणों में वे एक-दूसरे के संबंधित होते हैं। कैनेरी द्वीप से *जेलिडियमकेनेरीइन्स* से की प्राकृतिक जनसंख्याओं का विश्लेषण करने के लिए आरएएपीडी (RAPD) मार्कर का उपयोग किया गया, जिससे आनुवंशिक विविधता, भिन्नता का दर्जा और वितरण का अध्ययन किया

गया[23]। आईएसएसआर विश्लेषण के द्वारा चॉन्ड्रस क्रिस्पस के पॉपुलेशन और अर्धनग (Haploid) और द्विनग (Diploid) व्यक्तियों में अंतर का पता लगाने में उपयोगी पाया गया[13]। हाल ही में, आहार संसाधन के रूप में मान्यता प्राप्त की गई *जी. कोरोनोपिफोलिया* में उच्च उत्पादकता वाले स्ट्रेन की पहचान करने के लिए आरएएपीडी (RAPD) मार्कर का उपयोग किया गया[24]।

जी. चिलेंसिस में आरएएपीडी (RAPD) मार्कर के विश्लेषण ने जीनेटिक विविधता में वृद्धि तथा इंट्राक्लोनल विविधता का पता लगाया है[25]। माइक्रोसैटेलाइट मार्कर का उपयोग *जी. चिलेंसिस* में आनुवंशिक विविधता का अध्ययन करने के लिए भी किया गया है[26] A COI, cox 2-3, rbcL और 15 न्यूक्लियर माइक्रोसैटेलाइट मार्करों का उपयोग करके *जी. कॉडाटा* के भारतीय उपमहाद्वीप से विभिन्न पॉपुलेशन में आनुवंशिक विविधता और फायलोजियोग्राफी का अध्ययन किया गया है[27]। माइक्रोसैटेलाइट मार्करों द्वारा *जी. बर्डि,* और *जी. कॉडाटा* में जनसंगम प्रणाली को समझने में भी मदद मिली[28]। विभिन्न स्थानों से प्राप्त जनसंख्याओं के बीच भिन्नता का पता लगाने के लिए *जी. टेनूस्टिपिटाटा* के क्लोरोप्लास्ट जीनोम से आठ (SSR) माइक्रोसैटेलाइट मार्कर विकसित किए गए[29]। वर्तमान अध्ययन में, हमने पूर्व में विकसित लाल एगरोफाइट *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के माइक्रोसैटेलाइट मार्करों की पुष्टि की है[17]। हमने *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के विभिन्न पॉपुलेशन के नमूनों में माइक्रोसैटेलाइट मार्करों की मदद से आनुवंशिक विविधता का विश्लेषण करने का उद्देश्य रखा है।

सामग्री एवं विधि

नमूनों का संग्रह

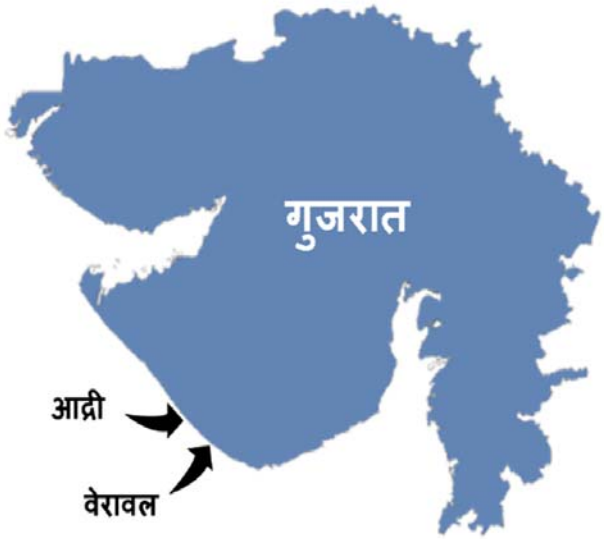
लाल अगरोफाइट *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के नमूने भारत के गुजरात राज्य के उत्तर-पश्चिमी तटों में वेरावल (20.910404° उत्तरी अक्षांश, 70.351273° पूर्वी देशांतर) और आद्री (20.961213° उत्तरी अक्षांश, 70.277051° पूर्वी देशांतर) से संग्रह किए गए (चित्र-1)। संग्रह जुलाई 2019 से फरवरी 2022 तक किया गया। नमूनों को अलग-अलग पॉलिथीन ज़िप लॉक बैग में संग्रह किया गया ताकि मिश्रित न हो और उसी दिन ही ठंडे स्थिति में प्रयोगशाला लाए गए थे। *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के थैलस को सतह पर जुड़े हुए रेतीले कणों और अन्य अनचाहे सामग्री को हटाने के लिए फ़िल्टर किए गए स्वच्छ समुद्री पानी से साफ किया गया। साफ करने के बाद, नमूनों को अलग-अलग प्रबंधित लैबोरेटरी की स्थिति (12:12 घंटे फोटोपीरियड, 25°C और 50 माइक्रोमोल फोटॉन्स मीटर 2 सेकंड की रोशनी) मे रख दिया गया।

डीएनए अलगाव (आइसोलेशन)

नमूनों से जीनोमिक डीएनए को, 17 द्वारा रूपांतरण की गई प्रक्रिया का पालन करके, आवश्यक संशोधनों के साथ अलग किया गया। थैलस (250 मिलीग्राम) को तरल नाइट्रोजन में एक सूक्ष्म पाउडर में पीसा गया और गर्म (65°C) सीटीएबी (CTAB) बफर [100 मिमी ट्रिस-सीएल (pH 8.0), 25 मिमी इडीटी, (EDTA), 2 मोलार सोडियम क्लोराइड, 0.2% v/v बी-मर्कैप्टोइथेनॉल और 2: w/v पीवीपी (PVP), के साथ निकाला गया। मिश्रण को 65°C पर 60 मिनट के लिए रखा गया और फिर बाद में फिनॉलः क्लोरोफॉर्मः आइसोएमिल अल्कोहल (25:24:1) और क्लोरोफॉर्मः आईसोएमिल आल्कोहल (24:1) के साथ अलग किया गया। शुद्ध एथेनॉल का उपयोग उत्पदन करने के लिए किया गया और 70% एथेनॉल से डीएनए को धोया गया। डीएनए पैलेट्स को डीएनेज मुक्त पानी में घुलाया गया। अलग किए गए जीनोमिक डीएनए की शुद्धता को दोनों स्पेक्ट्रोमेट्रिक रूप से (Nano Drop, ND-1000, Nanodrop Technologies Wilmington, Delaware, USA) 260 नैनोमीटर पर अवशोषण माप करके और 1% अगारोज जैल पर इलेक्ट्रोफोरेसिस के बाद यूवी प्रकाश के तहत प्रकाशित किया गया। स्टॉक डीएनए को PCR के लिए 50 (ng/µl) की कार्यसमाधान में पतला किया गया।

पीसीआर विस्तार और जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस

एक सेट में 5 एसएसआर प्राइमर्स थर्मो साइंटिफिक कंपनी से खरीदे गए। ये प्राइमर्स पिछले अध्ययन से चयनित किए गए थे[17]।



चित्र 1 – नमूना संग्रह किये गए साइटों को दर्शाता नक्शा

5 में से 3 एसएसआर प्राइमर्स ने अच्छे बैंड और प्रभाववादी प्रोफ़ाइल उत्पन्न किए, इन्हें चयनित किया गया। प्रत्येक प्राइमर के लिए, 25 µl प्रक्रिया मिश्रण में 19 µl टैक डीएनए पॉलीमरेज बफर ($MgCl_2$ के साथ) (थर्मो साइंटिफिक), 1 µl (50 ng/µl) जीनोमिक डीएनए, 1U टैक डीएनए पॉलीमरेज (थर्मो साइंटिफिक), dNTP मिक्स (थर्मो साइंटिफिक) और 0.5 µl प्रतिसाधारित (Reverse) और प्रतिचल (Forward) प्राइमर्स शामिल थे। प्रक्रिया मिश्रण को डीएनए थर्मल साइकलर (बायो-रैड) का उपयोग करके अलग पैरामीटर्स पर रखा गया। प्रारंभिक उद्दीपन 3 मिनट के लिए 95 °C पर और इसके बाद 35 बार आगे की प्रक्रिया जिसमें 94 °C पर 1 मिनट का उद्दीपन, 50 °C पर 1 मिनट का एनीलिंग, 72 °C पर 1 मिनट का विस्तार, और अंतिम विस्तार 7 मिनट के लिए 72 °C पर। पीसीआर प्रोडक्ट्स को 1 प्रतिशत एगरोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस प्रणाली पर विलयित और संकलित किया गया। डीएनए के बैंड्स को उज्ज्वलित रूप में देखने के लिए, जेल फ़ोटोग्राफ को बायो-रैड जेल डॉक एक्सआर+ प्रणाली से लिए गए।

सांख्यिकीय विश्लेषण

प्रत्येक एक्सेशन के लिए पुनर्निर्मत एसएसआर बैंडों की मौजूदगी (1) या अनुपस्थिति (0) निर्धारित मैनुअल स्कोरिंग प्रक्रिया से किया गया, जिससे एक बाइनरी गुणांक माला का निर्माण हुआ। *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* की आनुवंशिक विविधता का मूल्यांकन करने के लिए तीन मार्कर्स को चुना गया। बैंड गिनती पर आधारित मार्कर ज्ञानवर्धकता की मूल्यांकन करके प्राइमर बैंडिंग की विभिन्न विशेषताओं, जैसे बैंडों की कुल संख्या (टीबी), बहुरूपी बैंडों की संख्या (पीबी), और बहुरूपी बैंडों का प्रतिशत (पीपीबी) की गणना की गई। *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के आनुवंशिक प्रोफाइल का मूल्यांकन करने के लिए, इन मार्कर्स की उपयुक्तता का मूल्यांकन तीन पैरामीटरों का उपयोग करके किया गया जैसे बहुरूपी सूचना सामग्री (पीआईसी), मार्कर सूचकांक (एमआई), और रिजॉल्विंग पावर (आरपी)। पीआईसी मान की गणना निम्नलिखित सूत्र का उपयोग करके की गईः $PIC_i = 2f_i (1 - f_i)$, जहां PICi लोकस i की बहुरूपी सूचना सामग्री को प्रदर्शित करता है, fi संप्रेषित टुकड़ों की आवृत्ति है, और 1 - fi असंप्रेषित टुकड़ों की आवृत्ति है। आवृत्ति को प्रत्येक लोकस पर संप्रेषित टुकड़ों की संख्या और कुल प्रवेशों (लापता डेटा को छोड़कर) के बीच अनुपात के रूप में गणना की गई। प्रत्येक प्राइमर के लिए पीआईसी मान को उस प्राइमर के सम्बंधित सभी लोकस पर औसत पीआईसी मान के रूप में गणना की गई। मार्कर सूचकांक (Marker Index) की गणना प्रत्येक प्राइमर की क्षमता को वर्णन करने के लिए की गई, जो जीनोटाइप के बीच बहुरूपी लोकस का पता लगाने की क्षमता का चरित्रण करता है[30]।

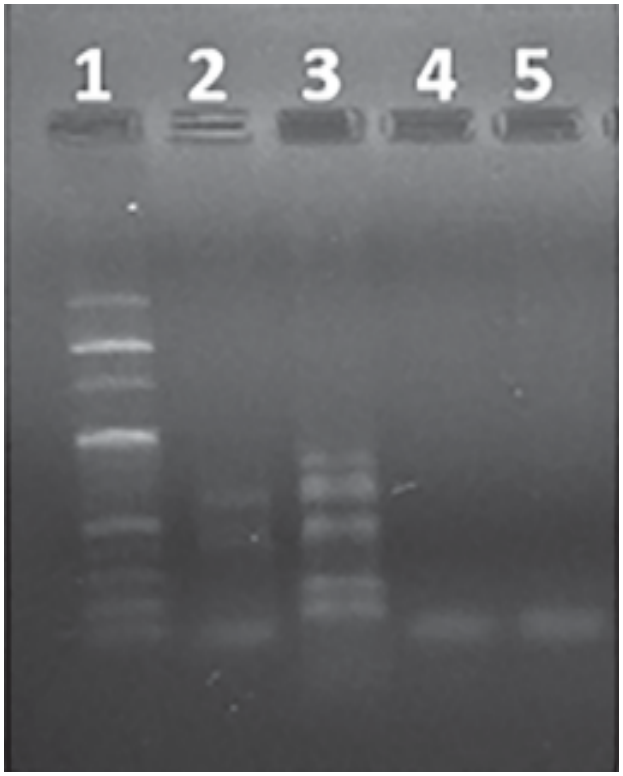
प्रत्येक लोकस्थान के लिए सूचनात्मक बैंडों की संख्या का आधार लेकर रिजॉल्विंग पावर (आरपी) को प्राप्त करने के लिए फार्मूला का उपयोग किया गया। आरपी = आरआईबी, जहां आरआईबी सूचनात्मक बैंडों को प्रदर्शित करता है। सूचनात्मक बैंडों (आईबी) को 0/1 स्केल पर मापा गया, इसके लिए निम्नलिखित सूत्र का उपयोग किया गयाः आईबी = $1 - 2 \times (0.5 - \text{पीआई})$, जहां पीआई i वाली पहुंच में शामिल एक्सेसन की प्रमाणिकता का प्रतिशत है।

इसके अलावा, आनुवंशिक विविधता का मापन करने के लिए शैनन वीवर के विविधता सूचकांक (एच') को मापा गया। इसका सूत्र $H' = -\sum (P \log(P))$ है, यहां H' विविधता सूचकांक है, पी संग्रह के प्रत्येक प्राकृतिक स्रोत का प्रतिशत है, और पी लॉग (पी) इस प्रतिशत का प्राकृतिक उल्गोरिद्म है[31]।

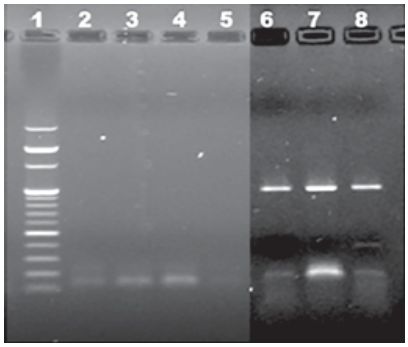
परिणाम एवं विवेचना

वर्तमान अध्ययन में लाल समुद्री शैवाल *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के 38 चयनित स्पेसीमेन्स की आनुवंशिक विविधता का मूल्यांकन किया गया है। इन स्पेसीमेन्स को वेरावल और आद्री नामक दो अलग-अलग स्थानों से प्राप्त किया गया था। किसी भी पॉपुलेशन में आनुवंशिक विविधता का अध्ययन महत्वपूर्ण है क्योंकि यह किसी भी प्रजनन और सुधार कार्यक्रम की मूल आधारभूतता का हिस्सा होता है। जलकृषि को केंद्रित करते हुए, यह उच्च आर्थिक मूल्य के लिए उपयुक्त नए खेती-बाड़ियों के विकास में मदद करता है। इस प्रकार, आनुवंशिक विविधता वर्तमान और भविष्य की आवश्यकताओं के लिए आदर्श और वांछित शैवाल की प्रजातियों का विकास और चयन करने मे अत्यंत उपयोगी सिद्ध होती है। *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के 38 स्पेसीमेन्स पर सभी 3 SSR प्राइमर्स द्वारा स्पष्ट और पुनरावृत्ति योग्य बैंड्स का निर्माण किया गया। Unigene B, Unigene C and Unigene D प्राइमर्स ने क्रमशः 28, 29 और 12 स्पेसीमेन्स में स्पष्ट बैंड्स उत्पन्न की। इन SSR प्राइमर्स द्वारा उत्पन्न उत्पादों की संख्या 1 से 6 तक हुई। Unigene B में अधिकांश उत्पादों की जांच में 6 उत्पादों के बैंड्स देखे गए। उत्पादों का आकार 100 से 1500 bp (Base pair) तक विभिन्न आकारों में उत्पन्न हुआ (चित्र 2 एचित्र 3 और चित्र 4)।

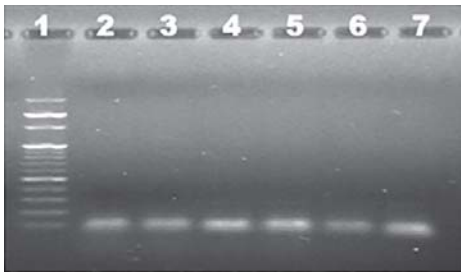
Unigene B में 13.15% प्रतिविषमता (PBP) का सर्वाधिक प्रतिशत देखा गया। यह Unigene C के लिए 11.11% और



चित्र 2 – Unigene B मार्कर का उपयोग करके उत्पादों के जैल छवि (लेन 1: 100 bp मार्कर, लेन 2: VER0719011, लेन 3: VER0719026 लेन 4: VER0719033, लेन 5: VER0719041)



चित्र 3 – Unigene C मार्कर का उपयोग करके उत्पादों के जैल छवि (लेन 1: 100 bp मार्कर, लेन 2: VER0121194, लेन 3: VER0121195, लेन 4: ADI0121196, लेन 5:ADI0121197, लेन 6: VER0220104 लेन 7: VER0121141 लेन 8: VER0121142)



चित्र 4 – Unigene C मार्कर का उपयोग करके उत्पादों के जैल छवि (लेन 1: 100 bp मार्कर, लेन 2: VER0121194, लेन 3: VER0121195, लेन 4. ADI0121196, लेन 5: ADI0121197, लेन 6: ADI0121198, लेन 7: ADI0121199)

Unigene D के लिए 10.71% था (तालिका 1)। *जी. ड्यूरा* के विभिन्न जीवन इतिहास चरणों के प्रोफाइलिंग के लिए ये SSR मार्कर्स का विश्लेषण करते हुए प्रतिविषमता 20% से 42% तक रहा[17]। प्रत्येक प्राइमर के लिए पीआईसी मानों की निर्धारण के लिए, सभी स्थानों के लिए पीआईसी मानों का औसत अध्ययन किया गया है। पीआईसी मान 0.25 से 0.35 तक रहे और Unigene D में 0.35 का उच्चतम पीआईसी मान देखा गया जबकि Unigene B में 0.25 का निम्नतम पीआईसी मान देखा गया। प्रति प्राइमर का औसत पीआईसी मान 0.29 प्राप्त हुआ (तालिका 1)। 0.25 से ऊपर पाए गए पीआईसी मान ने इसका प्रमाण दिया कि इन मार्कर्स में आवश्यक गुण हैं जो विविधता अध्ययन में उपयोग किए जाने के लिए आवश्यक होते हैं। इस अध्ययन में औसत पीआईसी मान (0.29% पहले के वर्णित मान (0.187) से अधिक था[17]।

तालिका 1 – *ग्रेसिलेरिया ड्यूरा* के विभिन्न नमूनों पर उपयोग किए गए प्रत्येक SSR प्राइमर के पैरामीटर और आनुवंशिक विविधता सूचकांक का विवरण (AT: एनीलिंग तापमान, TB:कुल बैंड की संख्या, PB: बहुरूपी बैंड, PBP: बहुरूपी बैंड प्रतिशत, PIC: बहुरूपी सूचना सामग्री, MI: मार्कर सूचकांक, RP: समाधान शक्ति और H´: शैनन वीवर्स अनुक्रमांक)

मार्करों की सिस्टम की सामान्य उपयोगिता का निर्धारण करने के लिए प्रत्येक प्राइमर के लिए मार्कर इंडेक्स (एमआई) की गणना की गई। सर्वाधिक एमआई Unigene B प्राइमर के साथ (0.92) और कम से कम Unigene D प्राइमर के साथ (0.45) देखा गया वही प्रति प्राइमर का औसत एमआई 0.75 प्राप्त हुआ। रिजॉल्विंग पॉवर (आरपी) एक मापक है जो प्रयोग किए गए प्राइमर्स की विभाजक प्राधिकरण क्षमता को दर्शाता है। सर्वाधिक आरपी मान Unigene B प्राइमर के साथ (4.41) और कम से कम Unigene C प्राइमर के साथ (2.89) देखा गया, वही प्रति प्राइमर का औसत आरपी 3.7 प्राप्त हुआ। शैनन वीवर की विविधता सूचकांक (एच') की गणना सभी पॉपुलेशन के बीच के लिए की गई जो Unigene B, Unigene C और Unigene D मार्करों के लिए क्रमशः 3.13, 3.2 और 2.29 थी (तालिका 1)।

शैनन वीवर की विविधता सूचकांक मान सामान्यतः 1.5 से 3. 5 के बीच होता है और हमारा मौजूदा अध्ययन में यह सीमा में आता है। मार्करों के बीच शैनन वीवर की विविधता सूचकांक सीमा के भीतर था, जो पॉपुलेशन की विविधता को दर्शाता है।

जी. ड्यूरा के जीवन इतिहास चरणों की प्रोफाइलिंग में भी आईएसएसआर मार्कर्स का उपयोग किया गया है, जो आनुवंशिक विविधता को वर्णन करते हैं[32]। एससीओटी (ScOT) मार्कर्स का भी *जी. ड्यूरा* के जीवन इतिहास चरणों के अंतर को विभाजित करने के लिए अध्ययन किया गया है[30]। एसएसआर मार्कर्स आनुवंशिक मार्कर्स के रूप में उपयोग किए जाते हैं और इसलिए ब्रीडिंग में व्यापक रूप से उपयोग किए जाते हैं। यह डीएनए में विविधताओं की प्रभावी खोज करने की क्षमता रखते हैं, जिससे विशिष्ट के बीच भेदों की पहचान हो सकती है। एसएसआर मार्कर्स व्यक्तिगत शैवाल के बीच डीएनए अंतर की पहचान करने के लिए पर्याप्त सूचनात्मक होते हैं। जनसंख्या में अधिक परिवर्तनशीलता की मौजूदगी एक ऊच्च स्तर की आनुवंशिक विभाजन को प्रतिष्ठान देती है, जो जनसंख्या के विचलन को और मजबूत करती है। वांछनीय विविध समूहों के चयन के लिए आनुवंशिक विभिन्नता उच्च महत्वपूर्ण होती है जो ब्रीडिंग और बागवानी जनसंख्या में आगे बढ़ने में काम आता है[33]। इसलिए, आनुवंशिक विविधता विशेषीकरण महत्वपूर्ण है क्योंकि यह संरक्षण रणनीति, उपयोगीकरण और सुधारित संस्करणों के स्थापना के लिए आधार प्रदान करता है[34]। एसएसआर मार्कर्स ने अपनी उपयोगिता साबित की है, स्ट्रेनों को सुधारने और प्रजनन कार्यक्रमों को सुविधाजनक बनाने में, विशेष रूप से समुद्री शैवाल की व्यापक खेती और उनके वाणिज्यिक उपयोग के लिए। इस अध्ययन के परिणाम *जी. ड्यूरा* के स्पेसीमेन्स के बीच अंतरों की अधिक गहराई को बेहतर रूप से समझने में सहायता प्रदान करते हैं।

आभार

लेखक सीएसआईआर-केंद्रीय नमक और समुद्री रासायनिक अनुसंधान संस्थान, भावनगर के निदेशक को सुविधा प्रदान के लिए आभारोक्ति प्रेषित करते हैं। इस शोध पत्र की सीएसएमसीआरआई पीआरआईएस मंजूरी संख्या 56/2023 है।

संदर्भ

1. Anis M, Ahmed S & Hasan M M, Algae as nutrition, medicine and cosmetic: The forgotten history, present status and future trends. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, **6**(6) (2017) 1934-1959
2. Santos R & Melo R A, Global shortage of technical agars: back to basics (resource management). J Appl Phycol **30** (2018) 2463-2473
3. Knoop J, Griffin J N & Barrento S, Cultivation of early life history stages of *Porphyra dioica* from the British Isles. J Appl Phycol **32** (2020) 459-471
4. Hafting J T, Craigie J S, Stengel D B, Loureiro R R, Buschmann A H, Yarish C, Edwards M D & Critchley A T, Prospects and challenges for industrial production of seaweed bioactives. Journal of Phycology, **51**(5) (2015) 821-837
5. Torres P, Santos J P, Chow F & dos Santos D Y, A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta). Algal Research, **37** (2019) 288-306
6. Mantri V A, Kambey C S, Cottier Cook E J, Usandizaga S, Buschmann A H, Chung I K, Liu T, Sondak C F, Qi Z, Lim P E & Van Nguyen N, Overview of global Gracilaria production, the role of biosecurity policies and regulations in the sustainable development of this industry. Reviews in Aquaculture, **15**(2) (2023) 801-819
7. Huang L B & Yan X H, Construction of a genetic linkage map in *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) and QTL analysis of several economic traits of blades. PloS One **14** (2019a)
8. Huang L B & Yan X H, Development of simple sequence repeat markers in *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) by high-throughput sequencing technology. Aquac. Res. **50** (2019b) 2646-2654
9. Zuccarello G C & West J A, Phylogeography of the *Bostrychia calliptera-B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. Phycologia **41** (2002) 49-60
10. Karp A, The new genetic era: Will it help us in managing genetic diveristy. In J.M.M. Engels, V. Ramanatha Rao, A.H.D. Brown & M.T. Jackson (Eds.), Managing plant genetic diversity (pp. 43-

56). Wallingford and Rome: CAB International and IPGRI (2002)

11. Intasuwan S, Gordon M E, Daugherty C H & Lindsay G C, Assessment of allozyme variation among New Zealand populations of *Gracilaria chilensis* (Gracialiares, Rhodophyta) using starch-gel electrophoresis. Hydrobiologia, **260** (1993) 159-165
12. Kamikawa R, Masuda I, Oyawa K, Yoshimatsu S, & Sako Y, Genetic variation in mitochondrial genes and intergenic spacer region in harmful algae Chattonella species. Fisheries Sciences, **73** (2007) 871-880.
13. Wang X L, Zhao F J, Hu Z M, Critchley A T, Morrell S L & Duan D L, Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic variation of *Chondrus crispus* populations from North Atlantic. Aquatic Botany, **88** (2008) 154- 159.
14. Guillemin M L, Destombe C, Faugeron S, Correa J A & Valero M, Development of microsatellites DNA markers in the cultivated seaweed *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Molecular Ecology Notes, **5**(1) (2005) 155-157
15. Zhang et al 2009a
16. Song S L, Lim P E, Phang S M, Lee W W, Lewmanomont K, Largo B D & Han N A, Microsatellite markers from express sequence tags (ESTs) of seaweed in differentiating various Gracilaria species. Journal of Applied Phycology, **25** (2013) 839-846.
17. Sambhwani K, Kazi M A, Mishra A & Mantri V A, De novo transcriptome analysis of industrially important agarophyte *Gracilaria dura* (Rhodophyta: Gracilariacae) revealed differential expression of genes in gametophyte and sporophyte life-phases. Algal Research, **65** (2022) 102712
18. Zhao J, Jiang P, Liu Z Y, Wang J F, Cui Y L & Qin S, Genetic variation of Ulva (Enteromorpha) prolifera (Ulvales, Chlorophyta)-the causative species of the green tides in the Yellow Sea, China. Journal of Applied Phycology, **23** (2011) 227-233
19. Pang Q Q, Sui Z H & Kang K H Application of SSR and AFLP to the analyses of genetic diversity in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodopyta). Journal of Applied Phycology, **22** (2010) 607-612
20. Bellorin A M, Buriyo A, Sohrabipour J, Oliveira M C, & Oliveira E C, *Gracilariopsis mclachlanii* sp. nov. and Gracilariopsis persica sp. nov. of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyceae) from the Indian Ocean. Journal of Phycology, **44** (2008)1022-1032.
21. Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S & Rafalski A, The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular breeding, **6** (1996) 225-238
22. Tautz D, Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic acids research, **17**(16) (1989) 6463-6471
23. Bouza N, Caujapé Castells J, González Pérez M Á & Sosa P A, Genetic structure of natural populations in the red algae *Gelidium canariense* (Gelidiales, Rhodophyta) investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Journal of Phycology, **42**(2) (2006) 304-311
24. Windarsih G, UTAMI D W & YURIYAH S, Genetic diversity and productivity of *Gracilaria coronopifolia* as alternative for food resource based on RAPD marker. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, **20**(12) (2019)
25. Meneses I, Santelices B & Sánches P, Growth related intraclonal genetic changes in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales: Rhodophyta). Mar. Biol. **135** (1999) 391-397
26. Guillemin M L, Faugeron S, Destombe C, Viard F, Correa JA, &Valéro M, Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid diploid red alga *Gracilaria chilensis*; how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. Evolution **62** (2008) 1500- 1519
27. Ayres-Ostrock LM, Mauger S, Plastino EM, Oliveira MC, Valero M & Destombe C, Development and characterization of microsatellite markers in two agarophyte species, *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria caudata* (Gracilariaceae, Rhodophyta), using next-generation sequencing. J Appl Phycol **28**(2016) 653-662
28. Ayres Ostrock L M, Valero M, Mauger S, Oliveira M C, Plastino E M, Guillemin M L & Destombe C, Dual influence of terrestrial and marine historical

processes on the phylogeography of the Brazilian intertidal red alga Gracilaria caudata. Journal of phycology, **55**(5) (2019)1096-1114

29. Song S L, Lim P E, Phang S M, Lee W W, Hong D D & Prathep A, Development of chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs) for the intraspecific study of *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta) from different populations. BMC research notes, **7**(1) (2014) 1-9
30. V A Mantri, Y Shah, N Balar, K Chavda, M Mavani, M Kolhe, K Sambhwani, R Meena, K Prasad, M G Kavale, R S Thakur, Limited-scale field trial confirmed differences in growth and agarose characteristics in life cycle stages of industrially important marine red alga *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta), J. Appl. Phycol. **33**(2021) 1059-1070
31. Ortiz-Burgos S, Shannon-Weaver Diversity Index. Encyclopedia of Earth Sciences Series, (2015) 572-573.
32. Gupta V, Baghel R S, Kumar M, Kumari P, Mantri V A, Reddy C R K & Jha B, Growth and agarose characteristics of isomorphic gametophyte (male and female) and sporophyte of Gracilaria dura and their marker assisted selection. Aquaculture, **318** (3-4) (2011) 389-396
33. M A Alam, A S Juraimi, Y Rafi, A A Hamid, I W Arolu & M A Latif, Application of EST-SSR marker in detection of genetic variation among purslane (*Portulaca oleracea L.*) accessions, Revista Brasileira de Botanica, **38** (2015) 119-129
34. G Li, W Ra, J Park et al., Developing EST-SSR markers to study molecular diversity in Liriope and Ophiopogon,"Biochemical Systematics and Ecology, vol. 39, no. 4-6 (2011) 241-252